

Modulation of DNA repair : studies on the xenobiotic activation of poly(adenosine diphosphate ribosylation) in humans

Citation for published version (APA):

Stierum, R. H. (1996). *Modulation of DNA repair : studies on the xenobiotic activation of poly(adenosine diphosphate ribosylation) in humans*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Rijksuniversiteit Limburg. <https://doi.org/10.26481/dis.19960209rs>

Document status and date:

Published: 01/01/1996

DOI:

[10.26481/dis.19960209rs](https://doi.org/10.26481/dis.19960209rs)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

In daily life, humans are exposed to a variety of chemical and physical agents. After uptake, these agents may, either directly or after metabolization, damage DNA, as well as other intracellular macromolecules, in various ways. For example, covalent adducts may arise from interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons like benzo[a]pyrene with DNA. Further, ultraviolet light may induce so called cyclobutane pyrimidine dimers. Also, ionizing radiation may result in the oxidation of DNA bases. As a consequence of DNA lesions, irreversible genetic alterations may arise upon processes involved in normal cellular physiology like DNA replication, DNA transcription and cell division. The onset of carcinogenesis is believed to be directly related to these alterations. In particular, structural alterations like DNA mutations in tumour-suppressor genes and proto-oncogenes are believed to result in loss of normal cell growth control and thus in the onset of cancer.

Fortunately, humans possess several DNA repair mechanisms which enables them to restore the genomic integrity before these cellular processes take place. One of the most clear examples illustrating the importance of DNA repair in preventing carcinogenesis is the disease Xeroderma Pigmentosum. Individuals affected by this disease have reduced DNA excision repair of certain kinds of UV-light-induced DNA damage and are believed therefore to be cancer-prone.

In Chapter 1, several DNA repair mechanisms have been discussed and it has been hypothesized that upregulation of DNA repair activities may prevent the onset of human carcinogenesis. Aim of this thesis was therefore to explore exogenous and endogenous factors which influence DNA repair in humans. In particular, the role of the DNA repair-associated enzyme poly(ADP-ribose) polymerase (PADPRT) was investigated. This nuclear enzyme is activated by DNA strand break-inducing agents, and upon activation transfers ADP-ribose units from intracellular NAD^+ to poly(ADP-ribose) polymers. As a consequence, intracellular NAD^+ becomes depleted.

In the past years, several functions for poly(ADP-ribosylation) (PADPR) have been proposed. For example, PADPR may serve to facilitate DNA repair and reduce irreversible DNA alterations either by influencing the accessibility of damaged DNA for other repair enzymes or by temporarily protecting DNA breaks from undergoing genetic recombination, that arise during the repair process. Taken this in mind, it was speculated that in humans exposed to carcinogens, upregulation of the activity of PADPRT may modulate DNA repair in a positive manner and consequently reduce DNA damage. Eventually, this may reduce cancer risk. Studies described in this thesis were performed which aimed to modulate the activity of PADPRT in humans, in relation to DNA damage and DNA repair processes.

To study DNA damage, DNA repair and PADPR, untreated human peripheral

blood lymphocytes (PBLs) and PBLs treated *ex vivo* with the DNA damaging agent (\pm)-anti-benzo[a]pyrene diolepoxide ((\pm)-anti-BPDE) were applied as a model. Treatment of mammalian cells with these reactive metabolites from the environmental carcinogen benzo[a]pyrene has been shown to result in formation of several DNA adducts and to induce DNA repair processes.

In Chapter 2 and Chapter 3 operationalization of measurements of (\pm)-anti-BPDE-induced DNA repair and PADPR in PBLs are described. The ^{32}P -postlabeling technique was found to be useful to measure the persistence of the main adduct involved in benzo[a]pyrene-induced carcinogenesis namely (\pm)-anti-BPDE-N²-dG, in PBLs treated *ex vivo* with (\pm)-anti-BPDE. Applying this method, it was found that in PBLs obtained from several donors most adducts are removed within 4 to 7 h after treatment. Further, interindividual variability was observed in both rate and extent of adduct removal. In Chapter 3, observations are described which indicate that PADPR is induced during DNA repair -assayed by means of measurement of DNA repair synthesis (UDS) and adduct removal- of (\pm)-anti-BPDE-induced DNA damage in PBLs. Given these results, it was concluded that PADPR might be involved in repair of (\pm)-anti-BPDE-induced DNA damage.

Since nicotinic acid is one of the precursors of NAD⁺, it was hypothesized in Chapter 4 that supplementation of humans with nicotinic acid may influence PADPR and consequently modulates the persistence of DNA damage for example induced by cigarette smoke. Therefore, the effects of *in vivo* nicotinic acid supplementation of male human smokers on niacin status, (\pm)-anti-BPDE-induced PADPR, (\pm)-anti-BPDE-induced DNA adduct removal, and lymphocytic cytogenetic damage were investigated. While nicotinic acid supplementation of smokers with at least 50 mg of nicotinic acid per day during a period of 14 weeks was effective in improving niacin status, neither a positive effect of supplementation on (\pm)-anti-BPDE-induced DNA adduct removal nor on (\pm)-anti-BPDE-induced PADPR was found. Further, the improved niacin status failed to reduce lymphocytic damage or mutagenesis. It was concluded that an improvement of niacin status in humans did not result in increased NAD⁺-dependent PADPR-mediated DNA repair in lymphocytes and consequently did not influence mutagenesis or chromosomal damage.

In Chapter 5, results are presented which indicate that age is associated with an individual's DNA repair capacity and with DNA damage. Prior to nicotinic acid supplementation, (\pm)-anti-BPDE-induced UDS, as a measure of DNA repair, was determined in PBLs obtained from the same population as described in Chapter 4. Further, lymphocytic SCE frequencies and MN frequencies were determined as markers for *in vivo* lymphocytic DNA damage. A negative correlation was observed between the extent of (\pm)-anti-BPDE-induced UDS and age. Further, parameters of *in vivo* lymphocytic DNA damage were negatively correlated with the extent of (\pm)-anti-BPDE-induced DNA repair and positively associated

with age of the donor. Based on these findings, it was concluded that, with increasing age, a reduction of lymphocytic DNA excision repair capacity may be responsible for accumulation of smoking-induced lymphocytic DNA damage. Further, these phenomena observed may resemble processes that are involved in age-related development of cancer in target organs in human smokers.

Chapter 6 describes experiments, designed to investigate whether pre-exposure of PBLs to low doses of (\pm)-*anti*-BPDE results in a reduction of chromosomal damage, induced at a later time point by higher doses ('challenge') of (\pm)-*anti*-BPDE. Further, experiments were performed to assess whether such an adaptation involves the modulation of DNA repair mechanisms, in particular PADPR. A preventive effect of pre-exposure on challenge-induced MN frequencies, as parameter of chromosomal damage, was observed in PBLs obtained from 4 individuals. The adaptation was found to depend on the concentration of (\pm)-*anti*-BPDE applied during pre-exposure. However, no relations were found between this adaptation and effects of low pre-exposure on the extent of PADPR and DNA repair synthesis, induced by high doses of (\pm)-*anti*-BPDE. Thus, it was concluded that the observed pre-exposure-induced reduction in (\pm)-*anti*-BPDE-induced chromosomal damage was not attributable to the induction of PADPR or excision repair mechanisms.

In chapter 7 the role of PADPR in carcinogen-induced accumulation of p53 tumour suppressor protein is described. Accumulation of p53 tumour suppressor protein in response to DNA damage, presumably DNA strand breaks, may induce mechanisms which serve to prevent the onset of carcinogenesis by eliminating damaged cells or by preventing them from being replicated. Given the fact that PADPR also proceeds rapidly after carcinogen-induced DNA strand scission, it was hypothesized that PADPR may be a potential interjacent event between carcinogen-induced DNA strand break formation and p53 accumulation. Experiments performed indicated that treatment of PBLs with (\pm)-*anti*-BPDE resulted in a time-dependent p53 accumulation. Further, treatment of PBLs with (\pm)-*anti*-BPDE in combination with 3-aminobenzamide, a PADPR inhibitor, resulted in increased p53 accumulation, in comparison to cell treated with (\pm)-*anti*-BPDE alone. This combination also potentiated the frequency of (\pm)-*anti*-BPDE-induced micronuclei, as marker for DNA breakage. Based on these findings, it was concluded that (\pm)-*anti*-BPDE-induced DNA strand break formation is responsible for the observed p53 accumulation. Finally, it was concluded that it is unlikely that PADPR is directly required in the process of p53 accumulation.

Samenvatting

In het dagelijks leven is de mens aan een verscheidenheid van chemische stoffen en fysische factoren blootgesteld. Na opname door het lichaam kunnen deze, óf direct óf na metabole omzetting, het DNA en andere intracellulaire macromoleculen op verschillende manieren beschadigen. Zo kunnen bijvoorbeeld covalente adducten ontstaan door de interactie van polycyclische aromatische koolwaterstoffen, zoals benzo[a]pyreen, met DNA. Daarnaast kan ultraviolette straling zogenaamde cyclobutaan pyrimidine dimeren veroorzaken. Een ander voorbeeld is de oxydering van DNA basen door ioniserende straling. Deze DNA beschadigingen kunnen, door normale cellulaire processen zoals DNA replicatie, DNA transcriptie en celdeling, worden omgezet in irreversibele genetische veranderingen, bijvoorbeeld DNA mutaties. Verondersteld wordt dat het proces van kankervorming (carcinogenese) direct gerelateerd is aan de aanwezigheid van deze veranderingen. Aangenomen wordt dat als deze structurele veranderingen optreden in tumor suppressor genen en proto-oncogenen, de normale controle over celgroei verloren gaat en kankervorming uiteindelijk optreedt.

Gelukkig bezit de mens verschillende DNA herstel mechanismen, welke hem in staat stelt om DNA schade te herstellen voordat deze cellulaire processen optreden. Een van de meest duidelijke voorbeelden welke het belang van DNA herstel illustreert is de ziekte Xeroderma Pigmentosum. Individuen met deze ziekte hebben verminderd DNA excisie herstel van bepaalde vormen van DNA schade en zijn daardoor gevoeliger voor het krijgen van kanker.

In hoofdstuk 1 zijn verschillende DNA herstel mechanismen besproken en werd verondersteld dat het stimuleren van DNA herstel mechanismen het ontstaan van kanker zou kunnen voorkomen. Doel van dit proefschrift was dan ook om verschillende exogene en endogene factoren te bestuderen, welke van invloed zijn op DNA herstel in de mens. In het bijzonder werd de rol van het DNA herstel-geassocieerd enzym poly(ADP-ribose) polymerase (PADPRT) bestudeerd. Dit enzym, aanwezig in de celkern, wordt geactiveerd door verbindingen welke breuken in het DNA induceren. Door activatie brengt het enzym ADP-ribose groepen over van intracellulair NAD⁺ naar poly(ADP-ribose) polymeren. Een van de gevolgen hiervan is dat het intracellulair NAD⁺ gedepleteerd raakt. In de afgelopen jaren zijn een aantal functies voor PADPR gedurende DNA herstel voorgesteld. PADPR zou bijvoorbeeld DNA herstel kunnen bevorderen en de mate van irreversibele genetische schade kunnen reduceren doordat het de bereikbaarheid van beschadigd DNA voor andere herstel enzymen gunstig beïnvloedt. Ook zou PADPR er voor kunnen zorgen dat DNA breuken, welke ontstaan tijdens DNA herstel processen, afgeschermd worden waardoor genetische recombinatie wordt tegengegaan. In hoofdstuk 1 werd daarom gehypothetiseerd dat, in mensen blootgesteld aan DNA

beschadigende verbindingen, stimulering van de activiteit van PADPRT DNA herstel in gunstige zin zou kunnen beïnvloeden en hiermee de mate van persistente DNA schade kan verminderen. Uiteindelijk zou dit de kans op het optreden van kanker reduceren. In dit proefschrift zijn daarom een aantal studies beschreven welke tot doel hadden om in de mens de activiteit van PADPRT te moduleren, in relatie tot DNA herstel en DNA schade. Als model om DNA schade, DNA herstel en PADPR te bestuderen zijn perifere bloedlymfocyten (PBL), al dan niet blootgesteld aan (\pm)-*anti*-benzo[a]pyreen diolepoxide ((\pm)-*anti*-BPDE), gebruikt. Bekend is dat deze reactieve metaboliëten van de in het milieu aanwezige carcinogene verbinding benzo[a]pyreen verschillende interacties met DNA kunnen aangaan en dat ze DNA herstelprocessen activeren.

In hoofdstuk 2 en hoofdstuk 3 is de operationalisering van methoden om (\pm)-*anti*-BPDE-geïnduceerd DNA herstel en PADPR te meten beschreven. De ^{32}P -postlabeling techniek bleek bruikbaar om, in geïsoleerde PBL blootgesteld aan (\pm)-*anti*-BPDE, persistentie van (\pm)-*anti*-BPDE-N²-deoxyguanosine adducten te meten. Dit is het belangrijkste DNA adduct verantwoordelijk voor benzo[a]pyreen-geïnduceerde carcinogenese. In PBL van verschillende donoren werd met deze methode gevonden dat de meeste (\pm)-*anti*-BPDE-geïnduceerde adducten binnen 4 tot 7 uur worden verwijderd. Verder bleek er interindividuele variabiliteit in mate en snelheid van adductverwijdering te bestaan. In hoofdstuk 3 zijn waarnemingen beschreven welke erop wijzen dat PADPR plaatsvindt gedurende herstel van (\pm)-*anti*-BPDE-geïnduceerde DNA schade. DNA herstel werd gemeten door middel van de bepaling van adduct verwijdering en door meting van DNA herstel synthese (UDS). Uit de resultaten van hoofdstuk 3 werd geconcludeerd dat PADPR betrokken zou kunnen zijn bij het herstel van (\pm)-*anti*-BPDE-geïnduceerde DNA schade in PBL.

In hoofdstuk 4 werd verondersteld dat suppletie van mensen met nicotinezuur PADPR gunstig zou kunnen beïnvloeden, aangezien NAD⁺ uit nicotinezuur gevormd kan worden. Als gevolg hiervan zou de mate van persistente DNA schade, bijvoorbeeld veroorzaakt door tabaksrook, in mensen gereduceerd kunnen worden. Om dit te onderzoeken werden, binnen een populatie van mannelijke rokers, de effecten van nicotinezuursuppletie op nicotinezuur status, (\pm)-*anti*-BPDE-geïnduceerde DNA adduct verwijdering, (\pm)-*anti*-BPDE-geïnduceerde PADPR en genetische schade in lymfocyten bestudeerd. Resultaten wezen uit dat terwijl nicotinezuursuppletie (minimaal 50 mg per dag, gedurende 14 weken) effectief was om de nicotinezuurstatus te verhogen, suppletie geen positief effect had op (\pm)-*anti*-BPDE-geïnduceerde PADPR en (\pm)-*anti*-BPDE-geïnduceerde adductverwijdering. Ook werd, als gevolg van de verbeterde nicotinezuurstatus, geen afname waargenomen in de mate van chromosomale schade en DNA mutaties gemeten in lymfocyten. Geconcludeerd werd dat een verbetering van nicotinezuurstatus in de mens niet leidt tot een

verbeterd NAD⁺-afhankelijk, PADPR-gemedieerd DNA herstel in lymfocyten en als gevolg hiervan de mate van lymfocyttaire DNA schade niet beïnvloedt.

In hoofdstuk 5 zijn een aantal bevindingen beschreven welke erop wijzen dat DNA herstel en DNA schade geassocieerd zijn met leeftijd. In de populatie mannelijke rokers beschreven in hoofdstuk 4 werd in PBL, vóór nicotinezuur suppletie, (±)-*anti*-BPDE-geïnduceerde UDS als maat voor DNA herstel bepaald. Ook werden lymfocyttaire zuster chromatiden uitwisselingen en micronuclei bepaald, als maat voor de *in vivo* aanwezige lymfocyttaire DNA schade. Tussen (±)-*anti*-BPDE-geïnduceerde DNA herstel en leeftijd werd een negatieve correlatie gevonden. Verder bleken parameters voor lymfocyttaire DNA schade negatief geassocieerd te zijn met de mate van (±)-*anti*-BPDE-geïnduceerde UDS en positief met de leeftijd van elke donor. Er werd daarom geconcludeerd dat, met toenemende leeftijd, een afname in lymfocytair DNA excisie herstel kan resulteren in accumulering van lymfocyttaire DNA schade, zoals veroorzaakt door roken. Verder werd gespeculeerd dat deze waarnemingen processen zouden kunnen weergeven welke ten grondslag liggen aan de leeftijdsafhankelijke toename in de vorming van kanker in doelwitorganen van rokers.

In hoofdstuk 6 zijn experimenten beschreven welke tot doel hadden om het effect van blootstelling aan een zeer lage dosis (±)-*anti*-BPDE op de mate van chromosomale schade in PBL, geïnduceerd door een hogere dosis (±)-*anti*-BPDE op een later tijdstip, te onderzoeken. Verder werd onderzocht of zo'n adaptatie te wijten zou kunnen zijn aan modulering van DNA herstel mechanismen, in het bijzonder van PADPR. In PBL van 4 donoren bleek blootstelling vooraf aan een lage doses (±)-*anti*-BPDE een preventief effect te hebben op het aantal micronuclei, als maat voor chromosomale schade, geïnduceerd door blootstelling aan een hoge dosis (±)-*anti*-BPDE op een later tijdstip. Deze adaptatie bleek verder afhankelijk te zijn van de concentratie (±)-*anti*-BPDE tijdens de voorblootstelling. De effecten van voorblootstelling op de mate van PADPR en DNA herstelsynthese, geïnduceerd door een hoge dosis (±)-*anti*-BPDE op een later tijdstip, bleken echter niet geassocieerd te zijn met de mate van adaptatie. Geconcludeerd werd daarom dat de waargenomen adaptatie niet toe te schrijven was aan de inductie van PADPR en DNA excisie herstel mechanismen.

In hoofdstuk 7 werd ingegaan op de mogelijke rol van PADPR in carcinogeen-geïnduceerde accumulering van p53 tumor suppressor eiwit. Accumulering van p53, als respons op DNA schade, in het bijzonder DNA breuken, zou andere intracellulaire mechanismen beïnvloeden welke het ontstaan van kanker kunnen voorkomen. De verwijdering van beschadigde cellen zou bijvoorbeeld worden gestimuleerd. Daarnaast zou p53 accumulering DNA replicatie in beschadigde cellen kunnen voorkomen, zodat het ontstaan van DNA mutaties wordt tegengegaan. Aangezien PADPR een proces is dat eveneens snel geactiveerd wordt door carcinogeen-geïnduceerde DNA breuken, werd verondersteld dat PADPR mogelijk een tussenliggende rol vervult bij inductie

van DNA schade en accumulering van p53. Uit de experimenten beschreven in hoofdstuk 7 bleek dat (\pm)-*anti*-BPDE behandeling van PBL resulteert in inductie van p53 accumulering. Verder bleek dat in PBL blootgesteld aan (\pm)-*anti*-BPDE in combinatie met 3-aminobenzamide, een remmer van PADPRT, p53 accumulering zelfs hoger lag dan in PBL alleen blootgesteld aan (\pm)-*anti*-BPDE. Deze combinatieblootstelling verhoogde eveneens het aantal micronuclei, als maat voor DNA breukvorming, in vergelijking met het aantal micronuclei gemeten in PBL blootgesteld aan alleen (\pm)-*anti*-BPDE. Geconcludeerd werd daarom dat (\pm)-*anti*-BPDE-geïnduceerde DNA breuken ten grondslag liggen aan de waargenomen p53 accumulering. Tenslotte werd geconcludeerd dat het niet waarschijnlijk is dat PADPR vereist is in het proces van p53 accumulering.